

0- 768582

На правах рукописи



Петров Алексей Михайлович

**РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В КРУГООБОРОТЕ
СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕРВНОГО
ОКОНЧАНИЯ ЛЯГУШКИ**

03.00.13 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2008

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации.

Научный руководитель -

чл.-корр. РАМН,
доктор медицинских наук,
профессор,
Зефилов Андрей Львович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор
Гайнутдинов Халил Латыпович

доктор биологических наук,
профессор
Бухараева Элля Ахметовна

Ведущая организация – ГУ научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН (г. Москва).

Защита состоится «4» апреля 2008 г. в « 14⁰⁰ » часов на заседании диссертационного Совета Д 212.078.02 при ГОУ ВПО «Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет» по адресу: 420021, г. Казань, ул. Татарстана, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет» по адресу: 420021, г. Казань, ул. Татарстана, 2.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000350461

Автореферат разослан « 11 апреля » 2008

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор медицинских наук,
профессор

Зефилов Т.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В пресинаптических нервных окончаниях (НО) химических синапсов содержится большое количество синаптических везикул, заполненных медиатором. В ответ на вход Ca^{2+} через потенциал управляемые Ca^{2+} -каналы в специализированных участках (активных зонах) происходит слияние (экзоцитоз) везикул с пресинаптической мембраной (Zefirov et al., 1995; Zhai & Bellen, 2004; Evans & Zamponi, 2006). В результате везикулярная мембрана встраивается в поверхностную и перемещается к сайтам эндоцитоза, где происходит захват мембранного фрагмента в НО, приводящий к образованию новой везикулы (Зефирова и др. 2003; Gundelfinger et al., 2003; Hinrichsen et al., 2006). Затем везикула транспортируется вглубь НО, заполняется медиатором и может повторно сливаться с мембраной активной зоны (АЗ), освобождая порцию медиатора. Таким образом протекает кругооборот (цикл) синаптических пузырьков в НО, который обозначается как рециклирование везикул (Betz & Angelson, 1998; Harata et al., 2006; Зефирова, 2007). Существование нескольких вариантов для каждого этапа везикулярного цикла приводит к большой вариативности времени кругооборота везикул, что по современным представлениям лежит в основе многих форм пресинаптической пластичности (Sun et al., 2002; Micheva et al., 2003; Gandhi & Stevens, 2003; Kavalali, 2006). В НО присутствуют несколько популяций везикул. Небольшая часть везикул, прикрепленная в АЗ и способная с высокой вероятностью секретировать медиатор, составляет готовый к освобождению медиатора пул (Зефирова и Черанов, 2000; Rizzoli & Betz, 2004; Becherer & Rettig, 2006). Другие везикулы, имеющие возможность быстро перемещаться из цитозоля к сайтам экзоцитоза и принимать активное участие в освобождении медиатора, формируют мобилизационный пул (Gaffield et al., 2006; Schoch & Gundelfinger, 2006). Во многих НО (в том числе двигательном НО лягушки) пополнение этих пулов обеспечивается клатрин зависимым “быстрым” эндоцитозом с плоской поверхности мембраны, а рециклирование таких везикул происходит по быстрому (мин и меньше) короткому пути (Richards et al., 2000, 2003; Kuromi & Kidokoro, 2005). При высокочастотной стимуляции в секрецию медиатора вовлекаются везикулы резервного пула, которые восстанавливаются “медленным” эндоцитозом при участии глубоких мембранных инвагинаций и эндосомо-подобных структур. В этом случае везикулы рециклируют по медленному (5-15 мин) длинному пути (Kuromi & Kidokoro, 2002; Richards et al., 2003, 2004; Петров и др. 2005; Rizzoli & Betz, 2005).

Контроль кинетики рециклирования синаптических везикул является одним из сложных нерешенных вопросов синаптологии (Wenk & De Camilli, 2004; Sudhof, 2004; Kavalali, 2006; Jahn & Sheller, 2006). Обсуждается роль Ca^{2+} зависимых реакций, малых ГТФаз, циклов фосфорилирования-дефосфорилирования мембранных фосфолипидов, перестройки цитоматрикса, различных протеинкиназ (Mousavi et al., 2004; Rohrbough & Broadie, 2005; Зефирова и др. 2006; DiPaolo & DeCailli, 2006; Zefirov et al., 2006).

Многие белки, обеспечивающие транспорт и кругооборот везикул, являются субстратами для фосфорилирования цАМФ- и цГМФ- зависимыми протеинкиназами А и G типов (Seino & Shibasaki, 2005; Hofmann et al., 2006; Snyder et al., 2006; Spiliotis & Nelson, 2006). Поэтому неудивительно, что изменения концентраций циклических нуклеотидов вызывают долговременные альтерации в секреции медиатора центральных и

периферических синапсов (Bukharaeva et al., 2002; Kleppisch et al., 2003; Яковлев и др. 2004; Verstrecken et al., 2005; Ситдикова и Зефилов, 2006; Lee H-K., 2006). Однако выброс медиатора на протяжении длительного времени или при ритмической активности может зависеть от любого этапа везикулярного цикла - экзоцитоза, эндоцитоза и транспортировки везикул. В связи с этим появилась необходимость исследований роли сигнальных каскадов цАМФ и цГМФ в кругообороте синаптических везикул, позволяющих прояснить некоторые феномены пресинаптической пластичности и механизм действия ряда нейроактивных соединений.

Цели и задачи исследования. Целью данного исследования явилось выявление роли сигнальных каскадов циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и гуанозинмонофосфата (цГМФ) в процессах, составляющих везикулярный цикл, двигательного нервного окончания (НО) лягушки.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие конкретные задачи:

1). Изучить динамику вызванной секреции медиатора, отражающую интенсивность экзоцитоза синаптических везикул при длительном высокочастотном раздражении.

2). Определить влияние стойких аналогов цАМФ (8-Br-cAMP, Bt₂-cAMP) и ингибитора аденилатциклазы (MDL) на вызванную секрецию медиатора в ответ на одиночные раздражения и высокочастотную стимуляцию.

3). Изучить динамику эндоцитоза и экзоцитоза синаптических везикул в двигательном НО, вызванных высокочастотной электрической стимуляцией, с помощью эндоцитозного флуоресцентного маркера (красителя) FM1-43.

4). Оценить действие аналогов цАМФ и ингибирования синтеза цАМФ на динамику эндоцитоза и экзоцитоза синаптических везикул.

5). Определить время и интенсивность кругооборота (рециклирования) синаптических везикул в норме, под влиянием аналогов цАМФ и ингибитора аденилатциклазы при длительном высокочастотном раздражении.

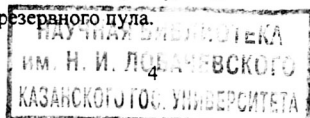
6). Исследовать действие негидролизуемых аналогов цГМФ (8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP), ингибиторов растворимой формы гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G1 (Rp-8-Br-PET-cGMP) на вызванную секрецию медиатора в ответ на одиночные раздражения и длительную ритмическую стимуляцию.

7). Оценить влияние аналогов цГМФ, ингибирования продукции цГМФ и блокирования протеинкиназы G1 на процессы эндо-экзоцитоза синаптических везикул.

8). Определить время и вклад кругооборота синаптических везикул в секрецию медиатора на фоне действия аналогов цГМФ, ингибитора растворимой гуанилатциклазы и протеинкиназы G1 при длительном высокочастотном раздражении.

Положения, выносимые на защиту:

1. цАМФ сигнальный каскад необходим для эффективного протекания ключевых этапов везикулярного цикла (экзоцитоза, эндоцитоза, транспортировки везикул в активную зону) в двигательном нервном окончании лягушки. С активацией цАМФ системы связано облегчение экзоцитоза везикул готового к освобождению пула и усиление эндоцитоза. В то же время стимулирование цАМФ зависимых ферментов негативно сказывается на перемещении везикул мобилизационного пула к сайтам экзоцитоза, поэтому секреция медиатора при длительной ритмической активности поддерживается везикулами резервного пула.



2. Сигнальный каскад цГМФ с помощью протеинкиназы G1 контролирует скорости эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул, а также транспортировку везикул мобилизационного пула в область активной зоны двигательного нервного окончания лягушки. При этом активация цГМФ зависимых ферментов способствует перемещению везикул мобилизационного пула в готовый к освобождению пул, усиливает эндоцитоз и значительно ускоряет рециклирование синаптических везикул в течение длительного ритмического раздражения.

Научная новизна. В работе впервые получены данные, предполагающие сложное влияние внутриклеточных сигнальных систем цАМФ и цГМФ на везикулярный цикл и участие мобилизационного и резервного пулов везикул в синаптической передаче при длительном ритмическом раздражении. В частности, впервые показано, что стимуляция цАМФ зависимых ферментов, ингибирование синтеза цГМФ и блокирование протеинкиназы G1 угнетают транспортировку везикул мобилизационного пула к сайтам экзоцитоза (активной зоне). В этих условиях секреция медиатора может обеспечиваться только за счет доставки в активную зону медленно рециклирующих везикул резервного пула. Представленные данные указывают на параллельную работу пулов синаптических везикул двигательного НО лягушки, по крайней мере, при определенных условиях.

Впервые обнаружено замедление эндоцитоза синаптических везикул при ингибировании цГМФ-протеинкиназа G1 сигнального пути и частичное блокирование эндоцитоза при уменьшении продукции цАМФ. Кроме этого, впервые показано существенное ускорение рециклирования синаптических везикул при активации цГМФ пути в нервно-мышечном синапсе лягушки.

Научно-практическая ценность. Результаты проведенного исследования могут послужить важными предпосылками для уточнения и развития современных теорий пресинаптической пластичности (лежащей в основе некоторых видов памяти, эмоций, поведения) и функционирования синаптического аппарата. Это, в частности, касается вопросов о механизмах участия везикулярных пулов в синаптической передаче и контроля времени кругооборота синаптических везикул сигнальными каскадами циклических нуклеотидов. Поскольку в поле зрения исследования были высоко консервативные процессы экзо-эндоцитоза, транспорта везикул и внутриклеточной сигнализации, то результаты работы могут быть полезны для объяснения явлений, происходящих в секреторных и нейросекреторных клетках, нейронах центральной нервной системы и клетках, активно использующих клатрин-зависимый эндоцитоз. Учитывая тот факт, что многие неврологические заболевания связаны с долговременными изменениями везикулярного цикла, полученные сведения могут оказаться интересными для выяснения этиологии подобных состояний. В целом, изложенные экспериментальные данные расширяют представления о механизмах, участвующих в регуляции передачи информации между возбудимыми клетками. Результаты работы включены в курс лекций по нормальной физиологии для студентов Казанского государственного медицинского университета. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (02-04-48822, 02-04-06118, 05-04-48428а, 06-04-49125), грантов «Ведущая научная школа» (НШ-1383, 2003.4, № НШ. 4520, 2006.4) и АН РТ (2309, 03-3.8-122).

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на конференциях и форумах: международном симпозиуме “Синаптогенез” (Вена, Австрия, 2003), съезде физиологов СНГ “Физиология и здоровье человека” (Дагомыс, 2005), международных конференциях “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пушино, 2005, 2006, 2007), международных конференциях по нейрехимии (Москва, 2005; Пенза, 2006), всероссийских конференциях с международным участием “Молодые ученые в медицине” (Казань, 2006, 2007), 10-й Пушкинской конференции “Биология науки 21 века” (2006), международном симпозиуме “Биологическая подвижность” (Пушино, 2006), 13 международном совещании по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006), 5-ом форуме нейронауки (Вена, Австрия, 2006), 20 съезде физиологов России (Москва, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе 6 публикаций в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

Структура и объем диссертации. Диссертация объемом 145 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования, обсуждения результатов исследования, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 400 названий, из них 10 отечественных и 390 иностранных авторов. Диссертация содержит 19 рисунков.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования, использованные растворы и химические вещества. Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах (кожно-грудинной и портняжной мышцы) лягушек (*Rana Ridibunda*) в осенне-зимний период. Мышцу фиксировали в стеклянной ванночке, заполненной раствором Рингера (pH 7.3; 20С°) для холодокровных (в мМ): NaCl-115.0, KCl-2.5, CaCl₂-1.8, NaHCO₃-2.4. Применяли мембранопроницаемые негидролизуемые аналоги цАМФ (100мкМ 8-Br-cAMP /8-bromo-cyclic AMP, 50мкМ Bt₂-cAMP /N⁶,0²-dibutyl-yl-cyclic AMP) и цГМФ (100мкМ 8-Br-cGMP /8-bromo-cyclic GMP, 50мкМ 8-pCPT-cGMP /8-para-chlorophenylthio-cyclic GMP); селективные ингибиторы аденилатциклазы (1мкМ MDL /cis-N-(2-Phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine), цитозольной гуанилатциклазы (1мкМ ODQ /1H-(1,2,4) oxidazole (4,3-a) quinoxalin-1-one) и протеинкиназы G (0,5 мкМ Rp-8-Br-PET-cGMP / Rp-8-bromo-β-phenyl-1,N²-etheno-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate). Концентрация 0,5 мкМ Rp-8-Br-PET-cGMP избирательно блокирует активность протеинкиназы G1 (Schwede et al., 2000). Для предотвращения сокращения мышцу рассекали или использовали d-тубокурарин (3 мкМ). Все вещества фирмы SIGMA (США).

Методы и схемы экспериментов. В условиях двухэлектродной фиксации мембранного потенциала мышечных волокон (с использованием стеклянных микроэлектродов, имеющих сопротивление 3-5 МΩ и заполненных 2.5 М KCl) регистрировали токи концевой пластинки (ТКП, рис. 1, В), которые усиливались и определялись их амплитудно-временные параметры, зависящие от интенсивности секреции медиатора из НО (Giniatullin et al., 2006). Двигательный нерв раздражали прямоугольными сверхпороговыми импульсами тока длительностью 0,5 мс. Сначала проводили “одиночные” раздражения с частотой 0,05 имп/сек. Затем стимулировали нерв с частотой 20 имп/сек в течение 3 мин, определяя динамику снижения амплитуды ТКП (такое раздражение считали “высокочастотным” или “ритмическим”). Вышеприведенную

схему эксперимента осуществляли в контроле (нормальный раствор Рингера) и через 40 мин действия исследуемого химического агента. *Электрофизиологические эксперименты выполнены совместно с А.Р. Гиниатуллин (асс. каф. норм. физиологии КГМУ, к.б.н.).*

В экспериментах применяли флуоресцентный краситель - FM1-43 (1-2 мкМ, "Biotium"), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза захватывается внутрь образующихся синаптических везикул ("загружается" в НО) (Betz & Bewick, 1993; Henkel et al. 1996; Зефилов и др. 2003). При этом в НО выявляются светящиеся пятна, отражающие скопления синаптических везикул, прошедших экзо- и эндоцитоз в окрестности АЗ (рис. 2, В). Для исследования динамики эндоцитоза FM1-43 апплицировали в течение 1 минуты в процессе и после высокочастотной (20 имп/сек) активности синапса в соответствии со схемой на рис. 2, А (Петров и др. 2005). Чтобы выяснить динамику экзоцитоза везикул, НО предварительно загружали красителем, стимулируя нервно-мышечный препарат в течение 3 мин с частотой 20 имп/сек в присутствии FM1-43. "Отмывку" красителя с поверхности мембран начинали через 15 мин после прекращения раздражения и продолжали около 40 мин. Затем двигательный нерв повторно стимулировали (20 имп/сек), анализируя снижение интенсивности свечения ("выгрузка" красителя, рис. 3; 7).

Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа МИКМЕД-2 ("ЛОМО", Санкт-Петербург), объектива Olympus LUMPLFL x 60 (0,90 Ч.А., водная иммерсия), комплекта светофильтров (450/30нм возбуждающий и 515/50нм эмиссионный фильтры) и дихроического зеркала (505нм). Изображения снимались видеокамерой F-VIEW-2 (экспозиция 0,5-1 сек) и обрабатывались с использованием программ Cell[^]P и ImagePro. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах (о.е.) яркости пикселя. В целях уменьшения фонового свечения и времени диссоциации FM1-43 от мембран (секунды) использовали ADVASEP-7 (3мкМ, "Biotium"). Значение фонового свечения, которое вычитали из картин флуоресценции НО, определяли как среднюю яркость свечения в квадрате 50 x 50 пикселей в участке изображения терминали НО, не содержащем светящихся пятен. Ширину (диаметр) нервных терминалей определяли как среднее расстояние между двумя противоположными краями мембраны НО.

Достоверность различий определяли с использованием Т-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Роль сигнального каскада цАМФ в кругообороте синаптических везикул

Эффекты аналогов цАМФ и ингибитора синтеза цАМФ на секрецию медиатора. При одиночных раздражениях двигательного нерва влияние мембранопроницающих негидролизруемых аналогов цАМФ (данные по 8-Br-cAMP и Bt₂-cAMP объединялись в одну выборку под названием "аналоги цАМФ") проявлялось в виде достоверного увеличения амплитуды ТКП на $18 \pm 3\%$ ($p < 0.05$, $n=10$, рис. 1, А).

В контроле ($n=6$) длительное ритмическое раздражение двигательного нерва сопровождалось характерными изменениями амплитуды ТКП (рис. 1, Б и В). После короткого периода облегчения наблюдалось постепенное уменьшение амплитуды ТКП. К 30 сек стимуляции амплитуда ТКП падала до $72 \pm 4\%$, а к 3 минуте до $16 \pm 4\%$ ($n=6$) от исходной (рис. 1, Б).

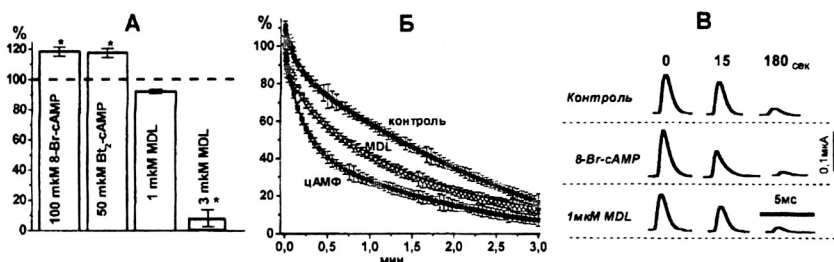


Рис. 1. Влияние аналогов цАМФ и ингибитора аденилатциклазы на секрецию медиатора.

А – изменение амплитуды ТКП при одиночных раздражениях. По оси ординат – амплитуда ТКП через 40 мин действия исследованного реагента (в % от исходной).

Б - динамика амплитуды ТКП в течение 3-х минут раздражения с частотой 20 имп/сек. По оси ординат – амплитуда ТКП (в % от амплитуды первого ТКП в ритмической серии). По оси абсцисс – время раздражения в мин. Черные кружки – значения в контроле, серые квадраты – на фоне действия аналогов цАМФ, светлые треугольники – на фоне действия селективного блокатора аденилатциклазы (1 мкМ MDL).

В - нативные ТКП в течение стимуляции 20 имп/сек (0, 15, 180 сек) в контроле и под воздействием используемых фармакологических реагентов.

Под действием аналогов цАМФ при высокочастотной активности депрессия амплитуды ТКП была выражена сильнее ($n=9$, рис. 1, Б и В). Особенно в начале раздражения, когда наблюдалось резкое падение амплитуды постсинаптических ответов (к 30 сек раздражения до $40 \pm 3\%$, $p < 0.05$). Для примерной оценки количества выделившихся из НО квантов медиатора (экзоцитоза) в процессе стимуляции (3 мин 20 имп/сек) проводили сравнение кумулятивных кривых амплитуд ТКП (рис. 4, А-В). Оказалось, что суммарная амплитуда ТКП (рис. 4, Б) на фоне аналогов цАМФ была на $37 \pm 4\%$ ($p < 0.05$) меньше, чем в контрольных экспериментах (рис. 4, А).

После обработки НО ингибитором аденилатциклазы (MDL) в концентрации, превышающей 2-3 мкМ, секреция медиатора практически прекращалась (рис. 1, А), что говорит о необходимости базальной активности аденилатциклазы для функционирования аппарата секреции (экзоцитоза). Поэтому в дальнейшем использовали концентрацию MDL 1 мкМ, которая вызывала только небольшое снижение амплитуды ТКП в ответ на одиночные раздражения (до $92 \pm 1.4\%$, $p < 0.05$, $n=6$, рис. 1, А). При этом длительное ритмическое раздражение сопровождалось более глубокой (чем в контроле) депрессией амплитуды ТКП (рис. 1, Б и В), протекающей равномерно на протяжении 3-х мин стимуляции. В условиях ингибирования аденилатциклазы (1 мкМ MDL) суммирование амплитуд ТКП (кумулятивные кривые амплитуды ТКП показаны непрерывными линиями на рис. 4) давало величину на $34 \pm 3\%$ ($n=6$, $p < 0.05$, рис. 4, В) меньшую, чем амплитуда ТКП в контроле (рис. 4, А).

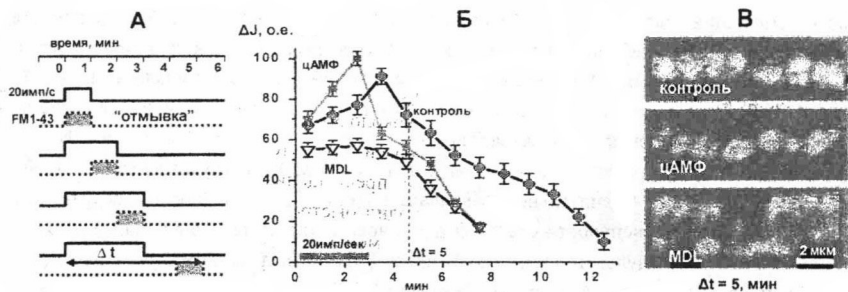


Рис. 2. Влияние изменения активности цАМФ системы на загрузку красителя FM1-43 в течение и после длительного раздражения с частотой 20 имп/сек.

А – схемы экспериментов. Стимуляция 20 имп/сек обозначена светлым столбиком, нарисованным непрерывной линией. Показаны моменты (Δt) аппликации FM1-43 в течение 1 мин (серые прямоугольники) при высокочастотной стимуляции (в течение 1, 2 и 3 мин) и после завершения 3-х мин раздражения. Препарат выдерживали в растворе с красителем в течение 1 минуты, затем начинали быструю “отмывку” мембран от красителя раствором Рингера с 3мкМ ADVASEP-7. При этом основная часть оставшегося на поверхности мембран FM1-43 переходила в раствор спустя несколько секунд.

Б - интенсивность флуоресценции при аппликации красителя (в соответствии со схемой рис. 2, А) в процессе и после высокочастотного раздражения. Первые три точки характеризуют захват красителя во время раздражения (20 имп/сек) – указано горизонтальной чертой. По оси ординат – интенсивность свечения (в о.е.), по оси абсцисс – время после начала раздражения (в мин). Остальные обозначения, что и на рис. 1, Б.

В - показаны участки загруженных ($\Delta t=5$ мин) терминалей НО при большем увеличении в контроле, под влиянием аналогов цАМФ и ингибитора аденилатциклазы (1мкМ MDL).

Влияние аналогов цАМФ и ингибитора аденилатциклазы на динамику загрузки и выгрузки красителя FM1-43 при высокочастотной активности. В контроле интенсивность флуоресценции в процессе ритмического раздражения (см. раздел методы и схемы экспериментов, рис. 2, А) незначительно возрастала (рис. 2, Б). После прекращения 3 мин стимуляции яркость свечения достигала максимума в течение первой мин - 91 ± 2 о.е. ($n=5$), затем медленно (за 9-10 минут) снижалась до уровня фона (рис. 2, Б). Морфометрический анализ (Зефилов и др. 2003) показал, что диаметр нервных терминалей в процессе и после высокочастотного раздражения колеблется в пределах $1,25 \pm 0,25$ мкм, а светящиеся пятна имеют характерную овальную форму и равномерно распределены по терминали с интервалом 0,5-1,5 мкм (рис. 2, В).

Под влиянием аналогов цАМФ рост флуоресценции в процессе ритмического раздражения был сильнее выражен (рис. 2, Б). После прекращения стимуляции спад свечения происходил быстрее: на 1-ой минуте флуоресценция падала до 63 ± 2 о.е. ($n=5$, $p < 0.05$), а к 5-6 минуте после завершения раздражения практически исчезала. Если сложить значения яркости свечения при минутных аппликациях красителя во время и после раздражения, в итоге получится величина, характеризующая “совокупный захват” красителя. На фоне действия аналогов цАМФ суммарный захват красителя

(соответствующий площади под кривой загрузки FM1-43 из рис. 2, Б) уменьшался примерно на 30% по отношению к контролю, а диаметр терминалей и конфигурация пятен не изменялись (рис. 2, В). Показательно, что в случае обработки НО аналогами цАМФ, более 50% красителя захватывалось во время раздражения ("накопленное" свечение за время раздражения / "совокупный захват" красителя, %), в контроле только около 30%.

На фоне ингибирования аденилатциклазы (1 мкМ MDL) нагрузка красителя в НО во время стимуляции значительно уменьшалась (рис. 2, Б), и после прекращения раздражения спад интенсивности свечения до фонового значения происходил быстро (в течение 5-6 мин). В результате суммарный захват FM1-43 был на $48 \pm 3\%$ меньше ($p < 0.05$), чем в контроле. Анализ изображений НО, загруженных FM1-43 после предварительного воздействия MDL, выявил отличия по сравнению с контролем: нервные терминали были расширены (диаметр терминалей увеличивался до 2.6 ± 0.1 мкм, $p < 0.05$), а светящиеся пятна располагались неравномерно по краям терминали и не имели характерной овальной формы (рис. 2, В).

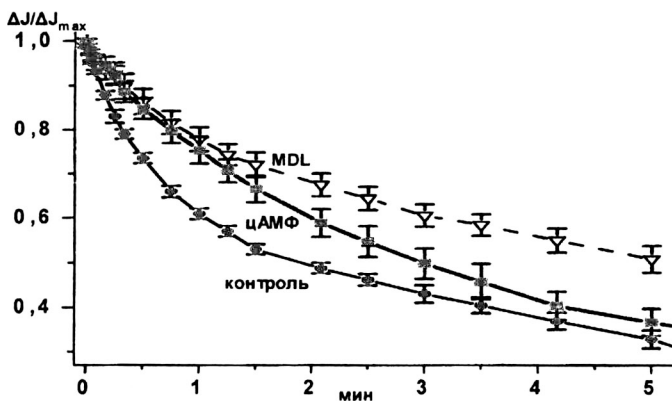


Рис. 3. Эффекты аналогов цАМФ и ингибитора аденилатциклазы (1 мкМ MDL) на динамику выгрузки красителя из НО при высокочастотной стимуляции.

Изображен спад интенсивности свечения во время стимуляции 20 имп/сек в предварительно загруженных FM1-43 нервных терминалях (см. раздел методы и схемы экспериментов). По оси ординат – относительная флуоресценция пятен НО: за 1 (или 100%) принята интенсивность свечения до начала высокочастотного раздражения. По оси абсцисс – время раздражения (в мин). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1, Б.

В контроле длительное высокочастотное раздражение НО, содержащих окрашенные FM1-43 везикулы (см. раздел методы и схемы экспериментов), приводило к двухфазному снижению интенсивности флуоресценции: сначала быстро (до $78 \pm 1.1\%$ за первые 20 сек раздражения), а затем медленнее (рис. 3). К 3 мин стимуляции яркость пятен уменьшалась до $43 \pm 2\%$ ($n=7$) от исходной величины, а через 15 мин непрерывной стимуляции пятна практически исчезали (рис. 7, Б: 900сек. "контроль").

Выгрузка маркера FM1-43 из НО, обработанных аналогами цАМФ, происходила медленнее ($n=7$, рис. 3), поскольку отсутствовала быстрая фаза снижения интенсивности

свечения в начале стимуляции (к 20 сек ритмического раздражения флуоресценция снижалась до $89 \pm 1.4 \%$, $p < 0.05$). Однако после 40-50 сек раздражения скорость выгрузки FM1-43 (судя по наклону кривой на рис. 3) уже в меньшей степени отличалась от контрольной, и к 3 мин интенсивность свечения уменьшалась до $50 \pm 3 \%$ ($p > 0.05$).

Под влиянием MDL ($n=11$) спад флуоресценции происходил медленнее (чем в контроле) на всем протяжении стимуляции (рис. 3): за 20 сек раздражения 20имп/сек яркость пятен НО снижалась до $90 \pm 2\%$ ($p < 0.05$), а к 3 минуте - до $60 \pm 3\%$ ($p < 0.05$).

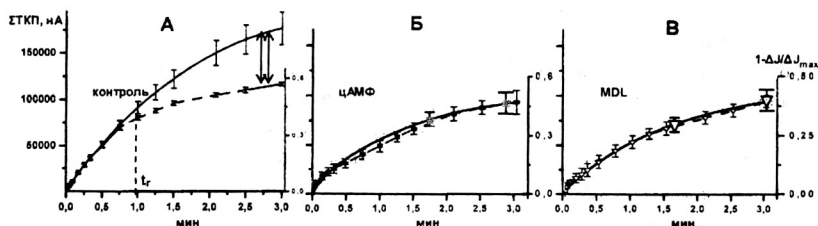


Рис. 4. Определение времени кругооборота (рециклирования) везикул в контроле и на фоне действия аналогов цАМФ и ингибирования аденилатциклазы.

А-В – сопоставление секреции медиатора и потери красителя при экзоцитозе везикул в процессе раздражения (20 имп/сек, 3 мин). Непрерывные линии – кумулятивные кривые амплитуды ТКП в процессе ритмического раздражения (получены из данных рис. 1, Б), пунктирные – кривые потери красителя (масштабированные перевернутые кривые выгрузки красителя из рис. 3). t_r – среднее время рециклирования, величина рассогласования к концу раздражения – двойная вертикальная стрелка (доля рециклирующих везикул). А – контроль, Б – на фоне действия аналогов цАМФ, В – на фоне действия ингибитора аденилатциклазы (1 мкМ MDL). На А-В по осям ординат – суммарная амплитуда ТКП в нА (ΣТКП, правая ось), уменьшение относительной интенсивности свечения ($1 - \Delta J/\Delta J_{max}$, левая ось). По осям абсцисс – время в мин.

Определение времени кругооборота синаптических везикул при изменении активности цАМФ системы. Кривая выгрузки FM1-43 (рис. 3) является показателем того, сколько содержащих краситель везикул слилось с пресинаптической мембраной. Однако в ходе экзоцитоза везикула, потерявшая медиатор и краситель, затем захватывается в НО эндоцитозом. В результате формируется свободная от красителя везикула. Экзоцитоз такой везикулы приведет к секреции порции медиатора, но не вызовет уменьшение флуоресценции пятен НО. Кумулятивная кривая ТКП (сумма амплитуд ТКП, рис. 4) указывает на то, какое количество медиатора выделилось из синаптических везикул к данному моменту времени. При этом детектируется общее количество событий экзоцитоза и не учитывается, что одна везикула может участвовать в секреции медиатора несколько раз на протяжении активности синапса. Поэтому, сопоставляя выгрузку красителя (перевернутая кривая потери красителя из рис. 3) и секрецию медиатора (кумулятивная кривая амплитуды ТКП) при длительном высокочастотном раздражении (рис. 4), возможно определить популяцию везикул, повторно участвующих в секреции медиатора, и время их рециклирования (Betz & Bewick

1993; Reid et al., 2003; Зефилов и др. 2008). Время, когда наблюдается явное расхождение усредненных кривых (т.е. скорость выгрузки красителя отстает от скорости секреции медиатора), соответствует среднему времени рециклирования везикул (t_r). Поскольку в НО содержится несколько пулов, то это время будет характеризовать кругооборот наиболее "скоростных" везикул. Величина расхождения между кривыми выгрузки маркера и секреции медиатора свидетельствует о том, какая часть везикул повторно участвовала в секреции медиатора.

Проведенный анализ показал, что в контроле время рециклирования составляет около 60 сек (рис. 4, А), а рассогласование между кривыми на рис. 4, А составляет около 30 % от суммарной амплитуды ТКП. Другими словами при данных параметрах стимуляции ~ 30 % общей секреции медиатора осуществлялось быстро рециклирующими везикулами готового к освобождению и мобилизационного пулов (Kurogi & Kidokoro, 2005; Rizzoli & Betz, 2005). Под влиянием аналогов цАМФ рециклирование сильно замедлялось (рис 4, Б), и расхождения между кривыми не было заметно на протяжении 3 мин раздражения ($t_r > 180$ сек). При ингибировании аденилатциклазы вырисовывалась аналогичная картина (рис. 4, В): в течение 3 мин кривые потери красителя и суммарной секреции медиатора совпадали. Таким образом, и блокирование продукции цАМФ, и стимуляция цАМФ пути замедляют рециклирование везикул и уменьшают размер функционирующего мобилизационного пула.

Роль сигнального каскада цГМФ в кругообороте синаптических везикул

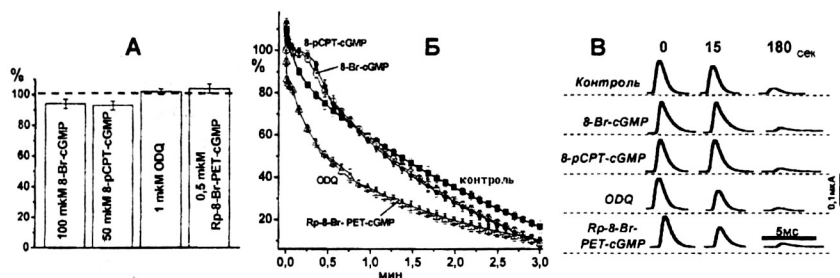


Рис. 5. Влияние аналогов цГМФ, ингибиторов цитозольной гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G (Rp-8-Br-PET-cGMP) на секрецию медиатора.

А – изменение амплитуды ТКП при одиночных раздражениях. По оси ординат – амплитуда ТКП через 40 мин действия исследованного агента (в % от исходной).

Б – динамика амплитуды ТКП в течение 3-х минут раздражения с частотой 20 имп/сек. По оси ординат – амплитуда ТКП (в % от амплитуды первого ТКП в ритмической серии), по оси абсцисс – время раздражения. Серые квадраты – значения в контроле, светлые и черные кружки – на фоне действия 100 мкМ 8-Br-cGMP и 50 мкМ 8-pCPT-cGMP, светлые и черные треугольники – 1 мМ ODQ и 0,5 мМ Rp-8-Br-PET-cGMP, соответственно.

В – нативные ТКП в течение стимуляции 20 имп/сек (0, 15, 180 сек) в контроле и под воздействием используемых фармакологических реагентов.

Эффекты аналогов цГМФ, ингибитора синтеза цГМФ и блокатора протеинкиназы G на секрецию медиатора. Активация цГМФ зависимых ферментов в НО с помощью стойких аналогов цГМФ (100мкМ 8-Br-cGMP или 50мкМ 8-pCPT-cGMP, n=10) не приводила к достоверным ($p > 0.05$) изменениям амплитуды ТКП в ответ на одиночные раздражения (рис. 5. А). Однако в первые 30 сек ритмического раздражения на фоне действия аналогов цГМФ падение амплитуды ТКП происходило существенно медленнее, чем в контроле. Последующее снижение амплитуды ТКП, наоборот, протекало ускоренно (рис. 5. Б и В). В итоге суммарная амплитуда ТКП под влиянием аналогов цГМФ менялась незначительно, составляя $91 \pm 7\%$ (8-Br-cGMP, n=6, $p > 0.05$) и $91 \pm 8\%$ (8-pCPT-cGMP, n=6, $p > 0.05$) относительно контроля (рис. 8. Б и В).

В условиях ингибирования продукции цГМФ (n=7) амплитуда вызванных одиночными раздражениями ТКП сохранялась на постоянном уровне (рис. 5. А). При высокочастотном раздражении изменения в динамике амплитуды ТКП на фоне действия ODQ (n=7) были противоположны эффектам 8-Br-cGMP и 8-pCPT-cGMP (рис. 5. Б). В начале регистрировалось резкое падение амплитуды ТКП, которое затем значительно замедлялось. Блокирование протеинкиназы G не оказывало влияния на амплитуду ТКП при одиночных раздражениях двигательного нерва (n=8, $p < 0.05$, рис. 5. А). В случае длительного высокочастотного раздражения на фоне Rp-8-Br-PET-cGMP (n=8) изменения темпа депрессии амплитуды ТКП были практически идентичны изменениям, наблюдаемым под воздействием ODQ (рис. 5. Б и В). При блокировании гуанилатциклазы и протеинкиназы G суммарная амплитуда ТКП снижалась до $62 \pm 5\%$ (n=7, $p < 0.05$) и $64 \pm 4\%$ ($p < 0.05$) относительно контроля (рис. 8. Г и Д). Это свидетельствует о соответствующем уменьшении количества квантов медиатора, освобождаемых из НО за 3 мин высокочастотного раздражения.

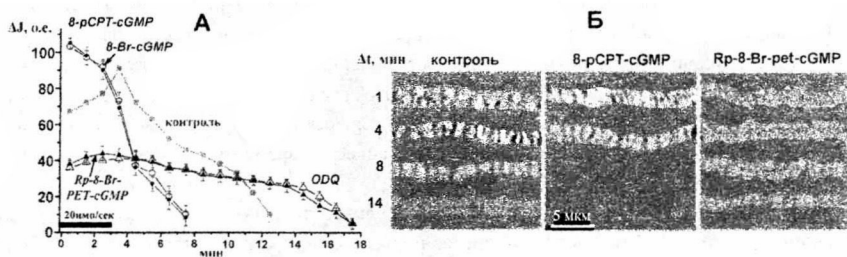


Рис. 6. Влияние изменения активности цГМФ системы на динамику загрузки красителя FM1-43 в НО.

А – интенсивность флуоресценции при аппликации (в течение 1 мин) красителя в процессе и после высокочастотного раздражения. Время раздражения (20 имп/сек) – указано горизонтальной чертой. По оси ординат – интенсивность свечения (в о.е.), по оси абсцисс – время после начала раздражения. Остальные обозначения, что и на рис. 5. Б. Б – флуоресцентные изображения участков нервных терминалей в контроле, на фоне действия аналога цГМФ (8-pCPT-cGMP) и блокатора протеинкиназы G (Rp-8-Br-PET-cGMP) после загрузки маркера в соответствии со схемой на рис.2. А (при разных Δt).

Влияние аналогов цГМФ, ингибитора гуанилатциклазы и протеинкиназы G на динамику загрузки и выгрузки красителя FM1-43 при высокочастотной активности. Под влиянием 8-Br-cGMP и 8-pCPT-cGMP (рис. 6. А и Б) максимальная интенсивность свечения (загрузка FM1-43) наблюдалась в 1-ую минуту раздражения (причем яркость пятен была больше, чем пиковое свечение в контроле). Во 2-ю и 3-ю мин раздражения флуоресценция колебалась в пределах 100-90 о.е. (в контроле 70-80 о.е.). После окончания трехминутной стимуляции яркость свечения снижалась быстрее, чем в контроле (рис. 6, А и Б). При действии аналогов цГМФ суммарная "поминутная" флуоресценция уменьшалась до $70 \pm 6 \%$ ($p < 0.05$, 8-Br-cGMP) и $68 \pm 5 \%$ ($p < 0.05$, 8-pCPT-cGMP), относительно контроля. Однако во время раздражения в НО загружалось существенно больше красителя (около 60%), чем в контроле (около 30%).

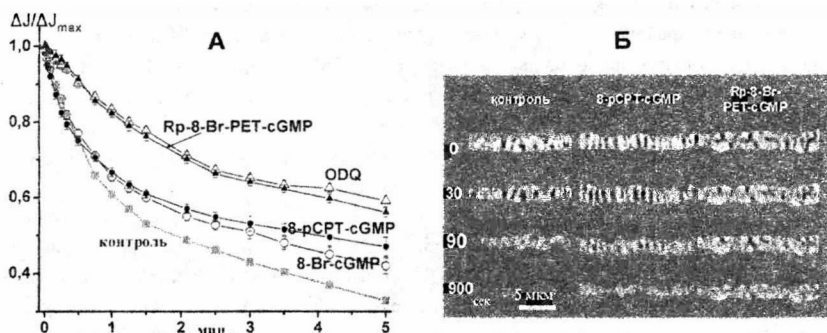


Рис. 7. Эффекты аналогов цГМФ, ингибиторов цитозольной гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G (Rp-8-Br-PET-cGMP) на динамику выгрузки красителя из НО.

А - Спад интенсивности свечения во время стимуляции 20 имп/сек в предварительно загруженных FM1-43 нервных терминалях. По оси ординат – относительная интенсивность свечения. $\Delta J/\Delta J_{\max}$ (за 1 принята яркость флуоресценции до начала стимуляции, $\Delta J_{\max}/\Delta J_{\max}$). На А и Б по осям абсцисс – время раздражения (в мин). Остальные обозначения - те же, что и на рис. 5, Б.

Б – флуоресцентные изображения участков нервных терминалей в контроле, под влиянием аналога цГМФ и блокатора протеинкиназы G при стимуляции с частотой 20 имп/сек на протяжении 0, 30, 90, 900 (15 мин) сек.

Обработка нервно-мышечного препарата ODQ вызвала сильное снижение флуоресценции НО (захвата красителя) при "минутной" аппликации красителя особенно в процессе высокочастотного раздражения (рис. 6. А). Кроме этого, отсутствовал четко выраженный максимум загрузки FM1-43, и захват красителя НО затягивался во времени, продолжаясь 13-15 минут после окончания раздражения. На фоне ингибирования протеинкиназы G (Rp-8-Br-PET-cGMP) происходили качественно и количественно одинаковые изменения в динамике захвата красителя (рис. 6. А и Б). Поэтому суммарная флуоресценция при блокировании и растворимой гуанилатциклазы, и протеинкиназы G, составляла $74 \pm 8 \%$ от контроля. При этом основная часть красителя (около 80%) захватывалась НО после стимуляции.

Устойчивые к гидролизу аналоги цГМФ ($n = 8+8$) не влияли на первоначальный (в течение примерно 30 сек) спад флуоресценции при высокочастотном раздражении, но заметно замедляли последующую выгрузку FM1-43 из НО (рис. 7, А и Б). Интересно, что в НО, обработанных аналогами цГМФ, даже после 15 мин непрерывного раздражения были заметны тусклые светящиеся пятна (рис. 7, Б).

На фоне действия ODQ ($n=8$) и Rp-8-Br-PET-cGMP ($n=8$) падение интенсивности свечения вначале (первые 20-30 сек) высокочастотного раздражения происходило медленнее (рис. 7, А и Б). Так, к 20 сек стимуляции яркость свечения снижалась только до $94 \pm 1.2\%$ ($p < 0.05$, ODQ) и $95 \pm 1.1\%$ ($p < 0.05$, Rp-8-Br-PET-cGMP) от исходной. Впоследствии выгрузка FM1-43 несколько ускорялась и протекала со скоростью близкой к таковой в контроле. Стоит отметить, что к 15 мин стимуляции пятна сохраняли около 1/3 от исходной интенсивности свечения (рис. 7, Б).

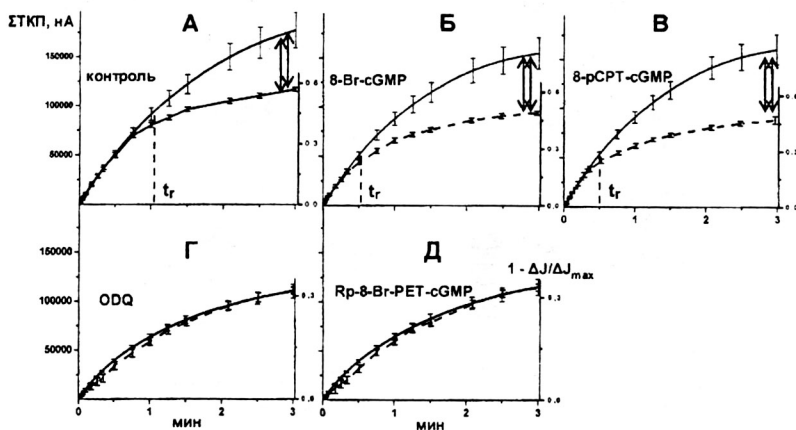


Рис. 8. Время кругооборота (рециклирования) синаптических везикул при активации и деактивации цГМФ системы.

А-Д - сопоставление кумулятивных кривых амплитуд ТКП по данным рис. 5, Б (непрерывные линии) и кривых потери красителя из рис. 7, А (пунктирные линии) при экзоцитозе везикул в процессе раздражения (20 имп/сек, 3 мин). А – контроль, Б и В – на фоне действия аналогов цГМФ (100 мкМ 8-Br-cGMP, 50 мкМ 8-pCPT-cGMP), Г – ингибитора растворимой гуанилатциклазы (1мкМ ODQ), Д – блокатора протеинкиназы G (0.5 мкМ 8-Rp-Br-PET-cGMP). На А-Д по осям ординат – суммарная амплитуда ТКП в нА (СТКП, правая ось), уменьшение относительной интенсивности свечения ($1 - \Delta J / \Delta J_{\max}$, левая ось). По осям абсцисс – время раздражения в мин. Остальные обозначения, что и на рис. 4.

Время кругооборота синаптических везикул при изменении активности цГМФ системы. Под влиянием 8-Br-cGMP и 8-pCPT-cGMP время рециклирования везикул (t_r) уменьшалось в 2 раза (до 30 сек, рис. 8, Б и В) по сравнению с контролем (рис. 8, А). Однако расхождение между кривыми потери красителя и суммы амплитуд ТКП составляло ~ 35%. Это означает, что на фоне действия аналогов цГМФ фракция рециклирующих везикул не изменяется. При ингибировании гуанилатциклазы и

протеинкиназы G (рис. 8, Г и Д) видимого расхождения между кривыми в течение 3 мин высокочастотного раздражения не наблюдалось. То есть в данных условиях кругооборот везикул продолжается более 180 сек. следовательно, вклад рециклирования везикул в секрецию медиатора отсутствует.

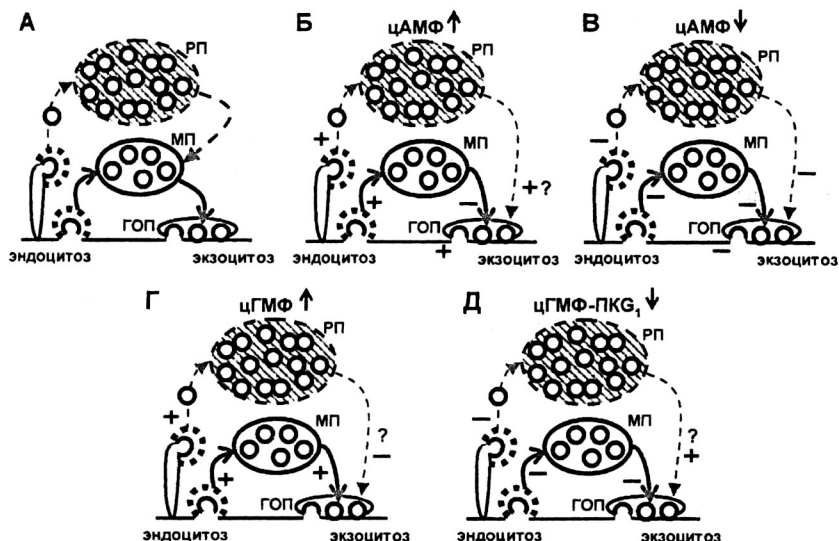


Рис. 9. Гипотетическая модель двух параллельных циклов синаптических везикул и роли сигнальных каскадов циклических нуклеотидов в кругообороте везикул.

А – Классическая модель (Richards et al. 2000, 2003; Rizzoli & Betz, 2005; Kavalali, 2006) последовательного функционирования готового к освобождению (ГОП), мобилизационного (МП), резервного (РП) пулов. Б, В, Г, Д – модели функционирования синаптических пулов, предполагающие существование двух самостоятельных везикулярных циклов (подробнее в тексте, Петров и др. 2008). Б – Активация цАМФ зависимых ферментов облегчает экзоцитоз везикул готового к освобождению пула и эндоцитоз везикул, но затрудняется передвижение везикул мобилизационного пула в активную зону. В – При ингибировании цАМФ системы “тормозится” протекание всех ключевых этапов везикулярного цикла. Г – Активация цГМФ зависимых ферментов облегчает передвижение везикул мобилизационного пула в сайты экзоцитоза и эндоцитоза везикул. Д – При ингибировании цГМФ системы происходят противоположные изменения. Сплошными стрелками показаны быстрый (короткий), а пунктирными – медленный (длинный) везикулярные циклы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты представленных экспериментов свидетельствуют об активном участии внутриклеточных сигнальных каскадов цАМФ и цГМФ в регуляции рециклирования синаптических везикул пресинаптического НО. Полученные данные интерпретировали в рамках современных представлений о везикулярном цикле, обеспечивающем

многократное использование синаптических везикул (Sudhof, 2004; Kuromi & Kidokoro, 2005; Rizzoli & Betz, 2005; Kavalali, 2006; Schoch & Gundelfinger, 2006; Зефирова, 2007).

Исходя из результатов проведенного исследования, можно описать роль цАМФ-пути в везикулярном цикле следующим образом (рис. 9. Б и В). С одной стороны, имитация увеличения внутриклеточного уровня цАМФ облегчает экзоцитоз везикул готового к освобождению пула (это проявляется в виде увеличения секреции медиатора при низкочастотном раздражении, рис. 1. А) и эндоцитоз синаптических везикул (судя по динамике захвата красителя, рис. 2. Б). С другой стороны, активация цАМФ пути затрудняет быстрое передвижение везикул мобилизационного пула к сайтам освобождения (А3), о чем свидетельствуют угнетение секреции медиатора (рис. 1, Б и В) и замедление выгрузки маркера в начале (первые 40 сек) высокочастотного раздражения (рис. 3). В этих условиях пополнение готового к освобождению пула вероятно обеспечивается за счет везикул резервного пула, восстанавливающихся с помощью медленного эндоцитоза. Поэтому скоростной кругооборот везикул по короткому пути не наблюдается (рис. 4. Б). Таким образом, стимулирование цАМФ-зависимых реакций в пресинаптическом НО является “проводником” рециклирования синаптических везикул по медленному пути (рис. 9. Б). В то же время фоновая активность аденилатциклазы важна для протекания всех ключевых этапов везикулярного цикла (рис. 9. В). Снижение продукции цАМФ негативно сказывается на процессах экзоцитоза (рис. 1. А) и эндоцитоза (рис. 2. Б и В), также нарушается доставка везикул к местам освобождения медиатора (рис. 1, Б и 3), в итоге рециклирование ослабляется (рис. 4. В). Получается, что как активирование, так и ингибирование цАМФ системы, действующие специфично на разные этапы везикулярного цикла (рис. 9. Б и В), приводят к снижению интенсивности кругооборота синаптических везикул мобилизационного пула.

Вторая часть нашего исследования посвящена цГМФ системе. Предполагается, что увеличение активности цГМФ зависимых ферментов (рис. 9. Г) способствует передвижению везикул мобилизационного пула в А3 и усиливает быстрый эндоцитоз. На это указывают – замедленная депрессия секреции медиатора в первые 15-20 сек высокочастотного раздражения (рис. 5. Б и В) и увеличение захвата эндоцитозного красителя в первую минуту раздражения (рис. 6. А и Б). В конечном счете, рециклирование везикул по короткому пути ускоряется (рис. 8. Б и В). Ингибирование цитозольной гуанилатциклазы или протеинкиназы G1 (рис. 9. Д), напротив, подавляет транспортировку в А3 везикул мобилизационного пула (рис. 5. Б и В, рис. 7. А и Б) и замедляет быстрый эндоцитоз (рис. 6. А и Б). Поэтому время кругооборота везикул в НО сильно увеличивается (рис. 8. Г и Д). Значит, в условиях деактивации цГМФ пути секреция медиатора осуществляется за счет доставки в готовый к освобождению пул везикул резервного пула, которые впоследствии медленным эндоцитозом захватываются в НО (рис. 9. Д). Совпадение эффектов при блокировании цитозольной гуанилатциклазы и протеинкиназы G1 (рис. 5. А, Б; рис. 6. А; рис. 7. А, рис. 8. Г, Д) говорит о доминирующей роли протеинкиназы G1 в контроле везикулярного цикла двигательном НО.

Современная гипотеза функционирования НО (рис. 9. А) предполагает последовательное опустошение синаптических везикулярных пулов при высокочастотной активности (Sudhof, 2004; Rizzoli & Betz, 2005; Kavalali, 2006). В частности, исследования Richards с коллегами (2000, 2003, 2004) свидетельствуют о том, что в двигательном НО

лягушки в течение первых 10-20 сек высокочастотного раздражения используется "рециклирующий" пул (готовый к освобождению + мобилизационный пулы). и только после его опустошения в экзоцитоз вовлекаются везикулы резервного пула. Однако в рамках данной модели сложно объяснить ситуации, имеющие место в выполненной работе. При активации цАМФ зависимых ферментов (рис. 9, Б) или ингибировании цГМФ – протеникиназа G1 пути (рис. 9, Д) мобилизационный пул в НО практически перестал работать. Поскольку не выявлялись везикулы, способные быстро транспортироваться к местам экзоцитоза (рис. 1, Б; 3, Б; 5, Б; 7, А) и затем в течение 40-60 сек рециклировать по короткому пути (рис. 4, Б; 8, Г, Д). Однако в подобных условиях в начале высокочастотной стимуляции секреция сохранялась (рис. 1, А и Б; 5, А и Б). Видимое противоречие исчезает, если допустить возможность транспортировки везикул резервного пула напрямую (минуя "заблокированный" мобилизационный пул) в пул готовый к освобождению при активации цАМФ или деактивации цГМФ систем (рис. 9, Б и Д). В связи с этим возникает предположение о параллельной работе мобилизационного и резервного пулов и наличии двух самостоятельных везикулярных циклов в НО (рис. 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования показано, что основные этапы везикулярного цикла (транспортировка везикул различных пулов в активную зону, экзоцитоз, эндоцитоз с последующим возвращением везикулы в определенный пул) находятся под постоянным контролем со стороны внутриклеточных сигнальных каскадов циклических нуклеотидов. При этом каждая из исследуемых систем вторичных посредников имеет собственное значение в кругообороте везикул. В частности, увеличение активности цГМФ или цАМФ зависимых ферментов избирательно способствует протеканию рециклирования везикул по быстрому или медленному пути, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Стимуляция цАМФ зависимых ферментов увеличивает амплитуду ТКП при одиночных раздражениях и усиливает депрессию вызванной секреции медиатора в первые 20-30 сек длительного высокочастотного раздражения. Уменьшение продукции цАМФ вызывает снижение амплитуды ТКП при одиночных раздражениях и более глубокую депрессию амплитуды ТКП на протяжении 3-х мин высокочастотной стимуляции.
2. Активация цАМФ сигнального пути существенно замедляет выгрузку красителя (показатель экзоцитоза синаптических везикул) в первые 20-30 сек высокочастотного раздражения, а блокирование аденилатциклазы угнетает выгрузку FM1-43 более равномерно на протяжении 3-х мин высокочастотной стимуляции.
3. Повышение активности цАМФ пути способствует увеличению захвата маркера FM1-43 (показатель эндоцитоза синаптических везикул) нервным окончанием в процессе раздражения. Снижение продукции цАМФ уменьшает загрузку маркера и ведет к нарушению эндоцитоза, что проявляется в виде расширения нервных окончаний и аномального расположения флуоресцирующих пятен.
4. В контроле время кругооборота (рециклирования) наиболее активной фракции синаптических везикул (t_r) составляет порядка 60 сек, а к 3-ей мин высокочастотного раздражения около 30 % от общей секреции медиатора обеспечивается за счет повторного

использования везикул. Увеличение, равно как и уменьшение активности цАМФ системы, ведет к существенному замедлению рециклирования синаптических везикул ($t_r > 180$ сек), поэтому вклад повторного использования везикул в секрецию медиатора при 3-х минутной стимуляции отсутствует.

5. Изменения активности цГМФ системы не влияют на амплитуду ТКП при одиночных раздражениях. Однако стимулирование цГМФ зависимых энзимов замедляет развитие депрессии вызванной секреции медиатора в первые 30-40 сек длительного высокочастотного раздражения, а ингибирование растворимой гуанилатциклазы приводит к усилению депрессии освобождения медиатора при высокочастотной стимуляции.

6. Повышение активности цГМФ сигнального каскада не оказывает достоверного влияния на выгрузку флуоресцентного красителя в начале высокочастотной стимуляции. Напротив, снижение продукции цГМФ вызывает резкое замедление выгрузки FM1-43 в первые 30-40 сек высокочастотного раздражения.

7. Активация цГМФ пути значительно увеличивает захват красителя нервным окончанием в течение длительного высокочастотного раздражения, а после выключения стимуляции загрузка маркера прекращается быстрее. Угнетение внутриклеточного синтеза цГМФ ведет к уменьшению захвата красителя в процессе стимуляции и продлевает его во времени.

8. В кругообороте синаптических везикул двигательного нервного окончания лягушки протеинкиназа G1 является главным исполнительным звеном цГМФ сигнального каскада.

9. Активация цГМФ зависимого пути ускоряет кругооборот (рециклирование) синаптических везикул ($t_r \sim 30$ сек) в течение длительного высокочастотного раздражения. Деактивация цГМФ - протеинкиназа G1 пути увеличивает время кругооборота везикул ($t_r > 180$ сек), при этом рециклирование везикул не дает вклад в секрецию медиатора во время 3-х минутной высокочастотной стимуляции.

ОСНОВНЫЕ ОПУБЛИКОВАННЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Петров А.М. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM1-43 / А.Л. Зефирова, П.Н. Григорьев, А.М. Петров, М.Г. Минлебаев, Г.Ф. Ситдикова // Цитология. – 2003. – Т. 45, № 12. – 2003. – С.1163-1171.
2. Петров А.М. Топография мест эндоцитоза синаптических везикул / А.М. Петров, М.М. Абдрахманов, П.Н. Григорьев // Вестник Российского государственного медицинского Университета. – 2004. – № 3 (34). специальный выпуск. – С.177-178.
3. Петров А.М. Особенности экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях холоднокровных и теплокровных животных / А.М. Петров, Г.Н. Мулюкова, И.М. Ганиева, Р.Д. Мухамедзянов, А.Л. Зефирова // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т. 4, приложение 1. – С. 30-31.
4. Петров А.М. Кинетика рециклирования синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки / А.М. Петров, А.Л. Зефирова // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2005. – С.178-181.
5. Петров А.М. Экзо-эндоцитозный цикл синаптических везикул как основа секреции нейромедиатора из нервных окончаний /А.Л. Зефирова, А.М. Петров // Международная

конференция «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва. 2005. – С.51.

6. Петров А.М. Особенности экзо-эндоцитозного цикла в двигательных нервных окончаниях пойкило- и гомойотермных животных / А.М. Петров, Г.К. Мулюкова, Р.Д. Мухамедзянов, А.Л. Зефирова // «Нейронауки: теоретические и клинические аспекты». – Донецк. 2005. – Т. 1. № 1. – С.94-95.

7. Petrov, A.M. Reactive oxygen species contribute to the presynaptic action of extracellular ATP at the frog neuromuscular junction / A.R. Giniatullin, S.N. Grishin, E.R. Sharifullina, A.M. Petrov, A.L. Zefirov, R.A. Giniatullin // J. Physiology. – 2005 – V. 565, № 1. – P.229-242.

8. Петров А.М. Внутриклеточный кальций и механизмы эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки / А.Л. Зефирова, М.М. Абдрахманов, П.Н. Григорьев, А.М. Петров // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 1. – С.34-41.

9. Petrov A.M. Regulation of synaptic vesicle recycling by cGMP signaling pathway / A.M. Petrov, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov // Abstr. of International symp. «Biological Motility». – Pushchino, 2006. – P.56-57.

10. Петров А.М. Роль цГМФ в регуляции синаптического цикла в двигательном синапсе лягушки // А.М. Петров, А.Р. Гиниятуллин, А.Л. Зефирова // Международная конференция «Нейрохимические метаболиты и энзимологические основы деятельности ЦНС». – Пенза, 2006. – с.63-64.

11. Petrov A.M. Synaptic vesicle recycling depends on cGMP – signaling pathway / A.M. Petrov, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov / 8 East European conference «Simpler nervous systems». – Kazan, 2006. – P.59.

12. Петров А.М. Экзо-эндоцитозный цикл синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях холоднокровных и теплокровных животных / А.М. Петров, Р.Д. Мухамедзянов // 13 международное совещание и 6 школа по эволюционной физиологии. – СПб, 2006. – С.148.

13. Petrov A.M. The kinetics of neurotransmitter release and endocytosis in frog and mouse neuromuscular synapse induced by rhythmic stimulation. / A.M. Petrov, R.D. Mukhamedzjanov, G.K. Mulukova, A.L. Zefirov / Abstracts of Fens Forum 5th of european neuroscience. – Viena, 2006. – P.469.

14. Петров А.М. цГМФ-зависимая регуляция рециклирования синаптических везикул / А.М. Петров, А.Р. Гиниятуллин, А.Л. Зефирова // «Неврологический вестник». – 2007. – Т. 39, № 1. – С. 207-208.

15. Петров А.М. Модулирование рециклирования синаптических везикул цАМФ сигнальным путем / Петров А.М., Гиниятуллин А.Р. // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2007. – С.132-135.

16. Петров А.М. Роль цГМФ в экзо-эндоцитозе синаптических везикул / А.М. Петров, А.Р. Гиниятуллин, А.Л. Зефирова // XX съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова. Тезисы докладов. – М.: Издательский дом «Русский врач», 2007. – С. 372-373.

17. Петров А.М. Роль цАМФ в секреции медиатора и экзо-эндоцитозном цикле синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки / А.М. Петров, А.Р. Гиниятуллин // Всероссийская конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2007. – С.303-304.

*Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф. 207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 9.01.2008г. Усл. п.л 1,0
Заказ № К-6496. Тираж 110 экз. Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.*

No 2